

**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**  
**MÉCANISMES BIOCHIMIQUES ET MOLÉCULAIRES**  
**CHEZ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IMPLIQUÉS DANS**  
**LA FORMATION DE QUELQUES COMPOSÉS VOLATILS**  
**DANS LES VINS**

**A REVIEW**  
**BIOCHEMICAL AND MOLECULAR MECHANISMS IN**  
***SACCHAROMYCES CEREVISIAE* THAT ARE INVOLVED IN THE**  
**FORMATION OF SOME VOLATILE COMPOUNDS IN WINES**

C. DELFINI, Chiara COCITO et M. BONINO

Istituto Sperimentale per l'Enologia, via P. Micca, 35, 14100 Asti, Italie

**Résumé :** L'arôme d'un vin provenant d'un cépage non aromatique se forme pendant la fermentation alcoolique. La levure peut intervenir sur les composés du moût avec beaucoup d'enzymes périplasmiques (estérases, glucosidases, lyases, lipases, protéases, peptidases, pectolytiques) et nombreuses sont les contributions scientifiques qui soulignent l'existence d'une d'interaction entre levure et cépage dans la détermination des caractéristiques aromatiques des vins. Outre l'apport individuel de composés sensoriellement actifs, la levure pourrait donc contribuer à la transformation de précurseurs aromatiques variétaux inconnus présents dans les baies et les moûts, dont la conversion attend d'être étudiée sous ses aspects biochimiques, génétiques et physiologiques.

**Summary :** There are evidences that a grape must of a non aromatic vine, not having perfume and revealing by gaschromatographie only some classes of compounds common to the musts of all the vine varieties, can originate a pool of characterizing fragrant substances after contact with the yeast during fermentation. Therefore, despite the scarce scientific knowledge available on biochemical mechanisms involved in *Saccharomyces cerevisiae* in the formation of a wine aromatic pattern, it can be likely hypothesized that the yeast could be the biological motor of this aromatic transformation. The yeast can act on the compounds of the must with many periplasmic enzymes (estérases, glycosidases, lyases, lipases, proteases, peptidases, pectolytiques) and several are the scientific contributions underlining the existence of an interaction between the yeast and the vine variety in the formation of wine aromatic characteristics. Besides the individual contribution of substances sensorially active, the yeast would contribute to the transformation of unknown varietal aromatic precursors that are in the grape skins and/or musts. The biochemical, genetic and physiological aspects of this transformation still have to be understood. At the end, we have to answer some important questions such as the mutual role that grape and/or yeast enzymes have during and soon after crushing in the liberation of the varietal precursors and in the conversion of these in fragrant compounds.

**Mots clés :** *Saccharomyces cerevisiae*, vin, moût, arômes variétaux, marqueurs aromatiques

**Keys words :** *Saccharomyces cerevisiae*, wine, grape must, varietal aromatic compounds, aromatic markers

## INTRODUCTION

Un moût d'un cépage non aromatique ne révèle aucune substance aromatique à l'analyse chromatographique sauf la présence de certaines classes de composés par ailleurs communs aux moûts de toutes les variétés. Le profil aromatique se modifie totalement pendant et après la fermentation avec l'apparition de nombreux composés facilement identifiables tant par

analyse sensorielle que chromatographique. On peut donc déduire que le travail effectué par la levure est important et doit être pris en compte par les vinificateurs. Outre l'apport individuel de composés sensoriellement actifs, la levure pourrait contribuer à la transformation de précurseurs aromatiques variétaux inconnus, présents dans les moûts, dont la conversion attend d'être étudiée sous ses aspects biochimiques, génétiques et physiologiques, aussi bien au niveau de

la levure (en tant que source d'activités enzymatiques aptes à transformer le précurseur en arôme (ou marqueur aromatique) qu'à celui du cépage (en tant que source primaire du précurseur).

Il semble donc intéressant de faire le point sur l'état des recherches à ce sujet et en particulier sur les connaissances scientifiques déjà acquises d'une part sur les caractéristiques biochimiques et physiologiques de la levure et d'autre part sur la composition des moûts de raisin. En effet, l'existence d'interactions entre levure et cépage dans la détermination des caractéristiques aromatiques des vins peut être déterminante.

### ETAT DES RECHERCHES DANS LE SECTEUR

Depuis que Pasteur exprima la conviction que « le vin ordinaire, son goût, ses qualités dépendent certainement, pour une grande partie, de la nature spécifique des levures qui se développent pendant la fermentation des raisins » (GALZY, 1974), de nombreuses expériences ont été effectuées pour démontrer l'influence de la souche de levure dans la détermination des caractéristiques de typicité de chaque vin. En réalité, les résultats obtenus par plusieurs auteurs étaient souvent en contradiction et mettaient en lumière une importante variabilité biologique à l'intérieur de la souche, de façon à annuler la signification des différences existant entre souches (USSEGLIO-TOMASSET et DI STEFANO, 1981). Nonobstant cela, en procédant au moyen de comparaisons rigoureuses, tant en laboratoire qu'en cave, on a réussi au cours des vingt dernières années à démontrer que les différences aromatiques étaient produites par des souches de *Saccharomyces cerevisiae* sélectionnées pour les vins suivants : Lambrusco (SOLI *et al.*, 1977 ; TINI *et al.*, 1976), Bianco di Custoza, Cortese dell'Oltrepò Pavese, Riesling dell'Oltrepò Pavese, Blanc de Morgex-La Salle, Moscato di Chambave (DELFINI, 1985, 1992a ; DELFINI *et al.*, 1982, 1994, 1995) et Sagrantino (CIANI et ROSINI, 1990).

Ce travail de sélection clonale des levures a été effectué uniquement par l'analyse sensorielle, au moyen de critères méthodologiques statistiques et de tests de dégustation éprouvés (Duo-Trio Test, Test de préférence et Test d'identification sensorielle d'un marqueur aromatique à l'aide de descripteurs aromatiques et d'un panel sélectionné de dégustateurs). Intéressants (voir plus loin), sont aussi les résultats expérimentaux qui démontrent, à travers l'analyse chimique, l'intervention directe et exclusive de la levure dans la transformation de précurseurs d'origine végétale en marqueurs aromatiques.

### CONNAISSANCES SUR LA CONTRIBUTION DE LA LEVURE DANS LA LIBÉRATION DE SUBSTANCES AROMATIQUES DANS LES MOÛTS

La production de métabolites sensoriellement actifs utiles (arômes) ou nuisibles (off-flavors) par la levure et contribuant à la formation du caractère aromatique d'un vin, dépend fortement des caractéristiques individuelles de la souche, de la température de fermentation, de la disponibilité d'oxygène (DELFINI, 1982, 1985 ; DELFINI *et al.*, 1992a, b, c ; HOUTMAN *et al.*, 1980a) et de métabolites rapidement assimilables (acides aminés, acides gras, stérols, caroténoïdes, etc.) (CONTERNO et DELFINI, 1994 ; DELFINI *et al.*, 1993 ; HOUTMAN *et al.*, 1980a,b, 1981). L'abondante littérature scientifique, décrite ci-après en témoigne.

**Terpènes des raisins.** Cette classe de composés odorants d'origine végétale est particulièrement présente dans les moûts de Muscat. Ils existent sous la forme libre (linalol,  $\alpha$ -terpinéol, nérol, géraniol) et sous la forme de mono et di-glucosides, inodores. Leur libération par voie enzymatique peut avoir lieu aussi bien grâce à des  $\beta$ -glucopyranosidases végétales ou celles périplasmiques de *Saccharomyces cerevisiae*, après intervention de  $\beta$ -D-apiofuranosidase, de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ou de  $\alpha$ -L-rhamnopyranosidase qui détachent le glucide terminal (BAYONOVE *et al.*, 1971, 1984 ; WILLIAMS *et al.*, 1980, 1982 ; WILSON *et al.*, 1984, 1986 ; ARYAN *et al.*, 1987 ; BIRON *et al.*, 1988 ; DARRIET *et al.*, 1988 ; NOBLE *et al.*, 1988 ; STRAUSS *et al.*, 1988 ; GÜNATA, 1994 ; GÜNATA *et al.*, 1985b, 1988, 1989, 1990abc ; CORDONNIER *et al.*, 1989 ; BRILLOUET *et al.*, 1990 ; VOIRIN *et al.*, 1990 ; MATEO et DI STEFANO, 1997).

Les  $\beta$ -glycosidases d'origine végétale sont fortement inhibées par le glucose, selon CORDONNIER *et al.* (1989) et DELCROIX *et al.* (1994), celles de la levure le sont seulement à raison de 20 p. cent en présence de 100 g/L de glucose ; en outre, 15 degrés d'alcool ont un effet inhibant sur 10 p. cent d'entre elles et une concentration en SO<sub>2</sub> de 50 mg/L n'a aucun effet.

Aux pH des moûts (2,8-3,8) les  $\beta$ -glucosidases d'origine végétale ou issues de culture d'*Aspergillus niger* sont très peu stables et actives (5 p. cent à un pH de 2,8), cette instabilité est moins prononcée avec celles d'origine levurienne.

Similairement aux formes glycosylées des terpènes volatils du Muscat, on a montré la présence d'autres

marqueurs aromatiques variétaux (WILLIAMS *et al.*, 1982 ; WINTERHALTER, 1992).

Enfin, la levure peut contribuer à la transformation du géranol en acétate de géranyle, du citronellol en acétate de citronellyle et du nérol en acétate de néryle (DI STEFANO *et al.*, 1992).

**Thiols.** Les composés soufrés de type thiols sont caractérisés par des notes très caractéristiques (cassis, buis, genêt, etc.) et par un seuil olfactif extrêmement bas.

Dans les vins du cépage Sauvignon, le dégustateur décèle des nuances herbacées à fruitées, évoquant le poivron vert, le buis, le genêt, le pamplemousse, le fruit de la passion, etc.

ALLEN *et al.* (1991) ont remarqué que l'odeur de poivron vert est due à des méthoxy-pyrazines (figure 1). DUBOURDIEU et DARRIET (1993), DARRIET *et al.* (1995), TOMINAGA *et al.* (1996 et 1998a) ont démontré que les notes de buis, de bourgeon de cassis, de feuille de tomate et de fruit de la passion, descripteurs utilisés par de nombreux auteurs, sont dues à un groupe de composés, parmi lesquels il faut citer la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one. (Selon la nouvelle règle de nomenclature internationale des composés chimiques (IUPAC), le préfixe sulfanyl doit remplacer le préfixe mercapto et le préfixe méthyl-sulfanyl doit remplacer le préfixe méthylthio). Ce composé existe dans les moûts sous forme de S-conjugués

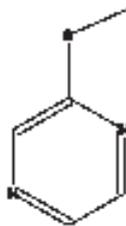


Fig. 1 – 2-méthoxy-pyrazine

Fig. 1 – 2-methoxy-pyrazine

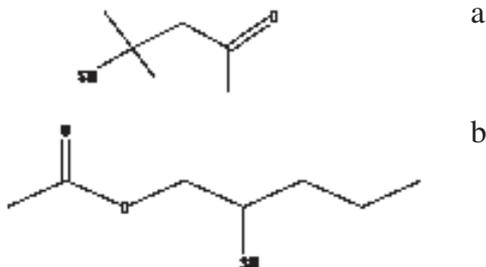


Fig. 2 - a : 4-méthyl-4-mercaptopentan-2-one  
b : 3-mercaptohexyl acétate

Fig. 2 - a : 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one  
b : 3-mercaptohexyl acetate

à la cystéine. Il est révélé au cours de la fermentation alcoolique ; cette libération est plus ou moins importante selon la souche de levure de *S. cerevisiae* qui réalise la fermentation (MASNEUF, 1996). Il faut également mentionner l'acétate de 3-mercaptohexyle formé par acétylation du 3-mercaptohexan-1ol (figure 2).

Le cas de ce cépage est intéressant. Il nous donne un nouveau modèle d'interaction entre la composition des raisins d'un cépage déterminé et la levure. Il pourrait donc être appliqué à l'étude d'autres variétés.

**Phénols volatils.** Ce sont des composés odorants et pour la plupart responsables de certaines déviations dans les vins. Leur présence est imputable à l'activité de la cinnamate décarboxylase (CD) de *S. cerevisiae* ; la spécificité de la cinnamate décarboxylase est étroite, seuls les isomères trans de certains acides de la série cinnamique peuvent être décarboxylés en vinyl-phénols. Parmi les acides cinnamiques du raisin, les acides p-coumarique et férulique sont décarboxylés et il se forme respectivement du vinyl-4-phénol et du vinyl-4-gaïacol (figure 3) (VERSINI *et al.*, 1990 ; CHATONNET 1993a et b). Ces composés peuvent donner au vin des défauts olfactifs et gustatifs quand ils sont présents en mélange (1 + 1) à une concentration supérieure à 700 µ/L. On associe aux vinyl-phénols une odeur douceâtre-florale, de caoutchouc si en excès (cas de 4-vinyl-phénol), de médicament, de phénol (caractère phénolique des vins), d'épices et de clou de girofle (cas de vinyl-gaïacol).

Après avoir démontré que l'activité décarboxylase sur les acides féruliques et p-coumariques est très fréquente chez *Saccharomyces cerevisiae*, GRANDO *et al.* (1993) ont considéré que ces phénols volatils sont responsables de la typicité aromatique des vins issus du cépage Gewürztraminer.

Selon CHATONNET *et al.* (1993b), l'activité cinnamate carboxylase de *S. cerevisiae* est endocellulaire, constitutive et exerce son activité uniquement pendant

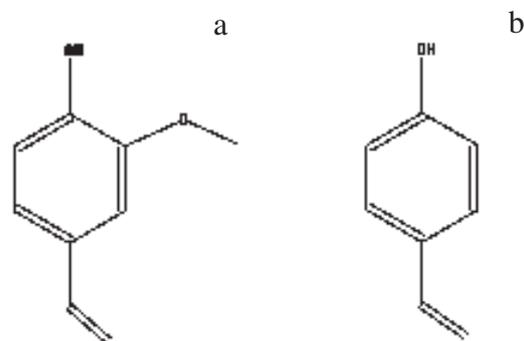


Fig. 3 - a : 4-vinyl-gaïacol ; b : 4-vinyl-phénol

Fig. 3 - a : 4-vinyl-guaiacol ; b : 4-vinyl-phenol

la fermentation alcoolique ; elle serait inhibée par la présence de composés phénoliques en particulier les procyanidines oligomères ( DUBOURDIEU *et al.*, 1989 ; BAYONOVE *et al.*, 1990). Il s'ensuit que les vinyl-phénols abondent seulement dans les vins blancs et dans les vins rosés obtenus par vinification en blanc des raisins rouges.

Les vins rouges ne contiennent donc que de faibles quantités de vinyls phénols, mais ils peuvent présenter des teneurs élevées en éthyl-phénols. Ces composés sont particulièrement malodorants, l'éthyl-phénol a une odeur d'écurie et l'éthyl-4-gaïacol, moins désagréable à des notes odorantes de type fumée épicée. Des études récentes montrent que ces composés sont principalement formés par des levures appartenant au genre *Brettanomyces* (ou *Dekkera*) ; l'espèce rencontrée dans le vin est *Brettanomyces bruxellensis* (CHATONNET, 1992). L'étude des mécanismes de la biosynthèse des éthyl-phénols par cette levure a mis en évidence l'action de deux enzymes. La première est une cinnamate décarboxylase qui contrairement à celle de *S. cerevisiae* n'est pas inhibée par les composés phénoliques. La seconde est une vinyl-phénol réductase qui transforme les vinyl-phénols formés par la cinnamate décarboxylase en éthyl-phénols. Certaines souches de *Pediococcus* et quelques lactobacilles peuvent de façon extrêmement limitée former des éthyl-phénols (CHATONNET *et al.*, 1992a et 1995 ; CAVIN *et al.*, 1993) ; *Leuconostoc oenos* serait incapable d'une telle activité à cause peut être du manque de transport spécifique (CAVIN *et al.*, 1993).

**Acides gras, stérols, caroténoïdes, norisoprénoides, esters d'acides aminés.** Les levures vinaires étant dotées de lipases (ROSE et HARRISON, 1989), peuvent contribuer à la libération dans le moût d'acides gras et de stérols, précurseurs d'esters éthyliques sensoriellement actifs (HOUTMAN *et al.*, 1980a,b ; HOUTMAN et DU PLESSIS, 1981 ; DU PLESSIS et VAN ROOYEN, 1982 ; DELFINI *et al.* 1992c ; RAVAGLIA et DELFINI, 1993). Même les caroténoïdes et les norisoprénoides sont des classes de composés étudiés par plusieurs auteurs comme des substances aromatiques primaires possibles ou des précurseurs de molécules aromatiques dans les moûts et dans les vins (DI STEFANO 1985a ; SIMPSON et MILLER, 1983 ; RAZUNGLER *et al.*, 1988 ; WINTERHALTER *et al.*, 1990).

Les levures peuvent enfin former des esters éthyliques d'acides aminés qui ont toutefois un seuil olfactif élevé (HERESZTYN, 1984 ; HERRAITZ *et al.*, 1993).

## COMPOSÉS DÉRIVANT DU MÉTABOLISME DE LA LEVURE

- **Terpènes des levures.** Outre les terpènes des raisins, déjà vus, il y a des terpènes de provenance levurienne. HOCK *et al.* (1984) ont remarqué que certaines souches de *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida stellata* et *Torulasporea delbrueckii* sont en mesure de produire, en milieu synthétique, jusqu'à 1572 µ/L de linalol, tandis que d'autres souches de *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus*, (ex. *uvarum*), *S. uvarum* peuvent produire jusqu'à 2346 µ/L de farnésol.

- **Acétaldéhyde**, associé à l'odeur de corne, d'oxydé et d'éventé.

- **Acides caprylique et caprique**, associés à l'odeur de fruit acide (odeur « caprylique » dans la bière).

- **Acide sulfhydrique, anhydride sulfureux et composés sulfurés** sont associés aux odeurs de lies, d'œufs pourris, alliacés, de mercaptan, de caoutchouc vulcanisé.

L'hydrogène sulfuré est directement issu du métabolisme levurien. Sa formation est sous la dépendance des enzymes responsables de la réduction des sulfates et de la biosynthèse de certains acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) pendant la fermentation et l'élevage (DELFINI, 1979).

Il se forme également d'autres composés soufrés volatils présentant des seuils de perception très bas et des notes olfactives pas toujours désirables lorsqu'on recherche un bouquet net et fin (GONIAK et NOBLE, 1987 ; RAUHUT, 1990). RAPP *et al.* (1985), CHATONNET *et al.* (1992), LAVIGNE *et al.* (1993), PARK *et al.* (1994) signalent par exemple les composés suivants, les plus significatifs sur le plan quantitatif : sulfure de carbone, méthyle mercaptan, éthyle mercaptan, sulfure de diméthyle, disulfure de carbone, sulfure de diéthyle, sulfure de diméthyle, 3-méthylthio-1-propanol, 2-méthyl-tétrahydro-3-thiophénone (figure 4). La levure forme aussi une petite quantité d'anhydride sulfureux (DELFINI *et al.* 1976, 1977)

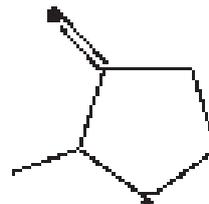


Fig. 4 – 2-méthyl-tétrahydro-3-thiophénone

Fig. 4 – 2-methyl-tetrahydro-3-thiophenone

- **Benzaldéhyde** : Ce composé est associé à l'odeur d'amande amère ; dans les vins blancs, son seuil olfactif est compris entre 3,0 et 3,5 mg/L. *S. cerevisiae* forme du benzaldéhyde en présence d'alcool benzylique et de basses concentrations en glucose (DELFINI et DI STEFANO, 1984 ; DELFINI, 1987 ; DELFINI *et al.*, 1991).

- **Acétamide** : Cette substance présente une odeur piquante ou d'urine de rat. Elle est produite surtout par des levures du genre *Brettanomyces*. CRAIG *et al.* (1984) et HERESZTYN (1986) ont relevé que l'odeur d'urine de rat peut être également due à l'acétyl-tétrahydropyridine (figure 5) produite tant par *Brettanomyces* que par *Lactobacillus*. Selon SCHREIER (1975), seuls les amines primaires peuvent être transformées en acétamides secondaires par *S. cerevisiae*, en conditions d'anaérobiose.

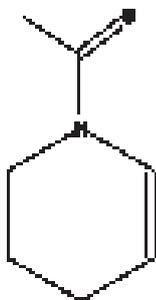


Fig. 5 – Acétyl-tétrahydropyridine

Fig. 5 – Acetyl-tetrahydropyridine

- **Octanol, octyle acétate**, associés à des odeurs de rose-orange-jasmin et pomme-citron et 3-méthyl-thio-propyle acétate, à une odeur de composés soufrés, de caoutchouc vulcanisé. Ils peuvent être produits en grande quantités à partir de *Schizosaccharomyces sp.*. Dans un vin de Muscat attaqué par des *Schizosaccharomyces japonicus v. versatilis*, on a relevé 340 µ/L d'octyle acétate, et environ 1 mg/L de octanol. En milieu synthétique, la même souche a produit en plus 1 mg/L de 3-méthyl-1-thiopropyl acétate (DI STEFANO et DELFINI, 1984).

- **Acétate d'éthyle**, associé à l'odeur d'acescence. Cet ester est produit par toutes les levures et par les bactéries acétiques ; les quantités formées sont très différentes d'une souche à l'autre.

- **Glyoxal et méthyl-glyoxal ou aldéhyde pyruvique**. Ce sont aldéhydes produites aussi bien par des levures que par des bactéries responsables de la fermentation malolactique (DE REVEL et BERTRAND, 1993) en quantités de l'ordre de quelques centaines de µg par litre. Ils sont indésirables surtout du point de vue hygiénique, tandis que l'on ne connaît pas leur contribution odoriférante.

- **Alcools et aldéhydes en C6**. Ces composés sont associés à des odeurs de fruits et aux notes herbacées. Selon HOUTMAN et DU PLESSIS (1985), l'origine de l'hexanol et de l'hexenal est le raisin, par contre l'hexanol acétylé a une origine levurienne. Selon GOMEZ *et al.* (1993) l'aldéhyde *trans*-2-hexenal et les alcools hexanol et *cis*-3-hexénol apparaissent principalement pendant les premières heures de la fermentation et les levures seraient les responsables de leur transformation successive.

- **Diacétyl**, associé à l'odeur de lait fermenté et de beurre. Ce composé est surtout présent dans des vins qui, suite à un développement des bactéries malolactiques (*Lactobacillus* et *Leuconostoc*), ont métabolisé de grandes quantités de glucose et de fructose et ont produit des quantités importantes d'acide lactique.

Le diacétyl semble provenir du métabolisme secondaire des levures ainsi que l'affirment RADLER (1962), FORNACHON et LLOYD (1965), GUYMOND *et al.* (1965), KUNKEE *et al.* (1965) et PILONE (1966) bien que beaucoup d'auteurs (POSTEL *et al.*, 1983 ; MASCARENHAS, 1984) pensent qu'il est exclusivement d'origine bactérienne, comme c'est le cas du 2-acétyl-lactate et de l'acétoïne (3-hydroxy-2-butanone-acétylméthylcarbinol). En réalité, ce dernier a été plusieurs fois identifié dans des milieux synthétiques fermentés par des souches de levure en culture pure (CIOLFI *et al.*, 1981 ; DI STEFANO *et al.*, 1981 ; ROMANO *et al.*, 1993). Toutefois, selon POSTEL *et al.* (1983) les levures dégradent rapidement le diacétyl, l'acétoïne et le 2-acétyl-lactate formés par les mêmes levures, soit au cours des premières phases de la fermentation alcoolique, soit par les bactéries.

En outre, les levures seraient en mesure de former également le 2-acétohydroxybutyrate et le 2,3-pentanedione.

- **Alcools à longue chaîne (alcools supérieurs)** associés à l'odeur d'alcool et de fruits mûrs (propanol-1) et à des notes douceâtres et piquantes (alcool isoamylique), quelquefois indésirables. Les quatre alcools à « longue » chaîne principalement produits par les levures sont les suivants : propanol-1, méthyl-2-propanol-1, méthyl-2-butanol-1, méthyl-3-butanol-1.

La formation de ces composés augmente sensiblement en présence de faibles teneurs en cation ammonium (USSEGLIO-TOMASSET, 1975) ou de grandes quantités de particules solides en suspension et particulièrement quand ces dernières ont une taille importante (KLINGSHIRN *et al.*, 1987) (par exemple dans les moûts non clarifiés).

- **Colloïdes glucidiques.** Les levures libèrent dans le moût en fermentation quelques centaines de mg/L de colloïdes glucidiques constitués principalement de mannanes et de glucanes et, en plus petites quantités, des polymères du galactose et du rhamnose. Ces derniers ont un fort pouvoir colmatant sur les membranes filtrantes (CASTINO, 1984 ; CASTINO et DELFINI, 1984, 1986) et agissent contre les précipitations tartriques (LUBBERS, 1993 ; MOINE-LEDOUX et DUBOURDIEU, 1999) ; leur importance d'une part sur le plan sensoriel ne semble pas encore définitivement démontrée (SCHOBINGER *et al.*, 1992) ainsi que d'autre part dans la formation du perlage des vins pétillants (MALVY *et al.*, 1994 ; ROBILLARD, 1994). Toutefois, FEUILLAT (1994) aurait démontré une influence importante des colloïdes des vins sur la volatilité des substances odorantes et donc sur l'intensité du bouquet.

### ENZYMES DE LEVURE IMPLIQUÉS DANS LA CARACTÉRISATION AROMATIQUE DES VINS

-  **$\beta$ -glucosidase, cinnamate décarboxylase.** On a déjà parlé de ces enzymes en ce qui concerne les terpènes et les phénols volatils.

- **Protéases périplasmiques et d'autolyse.** La libération de protéases protoplasmiques de la levure en phase autolytique a été montrée par plusieurs auteurs (LURTON, 1988 ; GIUDICI *et al.*, 1992, 1993) mais une controverse subsiste quant à leur inhibition par le pH et les polyphénols du vin. Selon LURTON (1988) l'endoprotéase A de *S. cerevisiae* est réellement active même à pH 3,0 et provoquerait la libération de peptides, sur lesquels cependant les métalloexopeptidases de cette même levure se révéleraient peu actives, étant dotées de pH optimaux plutôt élevés ; il s'ensuit que l'hydrolyse des protéines constitutives de la levure, par autolyse, se révélerait seulement partielle avec la libération de nombreux peptides et d'une petite quantité d'acides aminés libres.

On a confirmé au contraire que *Saccharomyces cerevisiae* possède des protéases extracellulaires capables d'hydrolyser *in vivo* l'hémoglobine et la caséine (FEUILLAT *et al.*, 1980 ; FEUILLAT et CHARPENTIER, 1982 ; ROSI *et al.*, 1987 ; ROSI, 1993) ajoutées au milieu en fermentation. Ce milieu possède en outre des peptidases périplasmiques liées au système de transport actif (CARTWRIGHT *et al.*, 1989) capables de détacher directement, à partir des protéines du milieu, des dipeptides ou tripeptides et de les utiliser comme source azotée sans une hydrolyse profonde. En fait, les levures vinaires sont en mesure de se multiplier dans un milieu ne contenant comme seule source

d'azote, que les protéines du moût (CONTERNO *et al.*, 1994).

L'importance technologique des protéases et des peptidases de la levure pendant la vinification est remarquable et concerne tant les aspects technologiques (par exemple clarification des moûts et des vins) que ceux nutritionnels pour la levure. Les acides aminés sont, en outre, des précurseurs aromatiques (ROUS et SNOW, 1983). *Leuconostoc oenos*, la bactérie malolactique du vin, possède aussi des peptidases et des  $\beta$ -glucosidases (GUILLOUX *et al.*, 1993).

- **Estérases.** Les estérases d'intérêt œnologique sont surtout : 1) les arylestérases (appelées également les A estérases) qui ont comme substrats les esters aryliques (ex. phénylacétate) ; 2) les carboxylestérases (appelées également B estérases) qui ont comme substrat les esters des acides carboxyliques avec les alcools aliphatiques ou aromatiques (ex. butyrate d'éthyle, valérate d'éthyle, caproate d'éthyle, caproate d'éthyle, etc. 3) les acétyl-estérases (appelées également C estérases) qui ont comme substrat les esters de l'acide acétique (ex. acétate d'éthyle, d'isoamyle, d'isobutyle) (DELL'ORO *et al.*, 1992).

SUOMALAINEN *et al.* (1972) et PARKKINEN *et al.* (1982a,b), ont démontré l'existence de lipases, de phospholipases et de carboxylestérases dans la membrane cellulaire plus particulièrement dans la zone située entre cette dernière et la paroi. Ces enzymes contribuent aussi bien à produire des esters (par exemple ceux des acides gras de C4 à C16 atomes de carbone) pendant la fermentation alcoolique qu'à les hydrolyser pendant la phase stationnaire de croissance, en restant actives longtemps après la mort de la cellule (DELFINI, 1992b).

Les moûts, dès le pressurage, présentent une intense activité estérasique, tandis que des valeurs nettement inférieures ont été trouvées dans les vins correspondants (BARDI *et al.* 1992). Dans ces derniers, l'activité enzymatique se maintient même après le vieillissement, ce fait démontre une certaine résistance des estérases à l'action inhibitrice de l'alcool et des tanins. La spécificité de ces enzymes est modifiée lors du passage du moût aux vins. Les estérases du moût sont actives sur les esters d'acides de 4 à 18 atomes de carbone, tandis que sur le vin, les esters des acides C12, C14 et C16 ne sont pas hydrolysés. Cette observation indique que les estérases présentes dans les moûts sont progressivement rendues inactives pendant la fermentation et remplacées par celles libérées par les levures (BARDI *et al.*, 1992). En fait, ces nouvelles enzymes présentent une activité sur le caprylate et sur le butyrate, le caproate, le caprate et le stéarate d'éthyle (PARKKINEN et SUOMALAINEN, 1982a,b ;

SUOMALAINEN 1981), tandis que le laurate, le myristate et le palmitate ne sont pas hydrolysés. Les bactéries malolactiques (*Lactobacillus* et *Leuconostoc*) sont aussi dotées d'activité estérasiq ue importante et peuvent donc contribuer à réduire et modifier le profil aromatique d'un vin (BARDI *et al.*, 1992).

- **Enzymes pectolytiques.** Les pectines sont des polysides constitués par des chaînes d'homogalacturonanes (chaînes d'acide galacturonique liées en  $\alpha$ -1,4) et par des rhamnogalacturonanes (l'acide D-galacturonique est alterné avec le L-rhamnose avec liaison 1,2) ramifiés avec des glucides neutres (galactose ou arabinose liés au rhamnose en 1,4). Les groupes hydroxyles de l'acide galacturonique en position 6 sont en outre estérifiés avec de l'alcool méthylique. Ces deux types de pectine participent avec la cellulose et hemicellulose à la construction du réticule tridimensionnel de la paroi cellulaire végétale, au moyen de liens covalents, ioniques et physiques.

Les enzymes pectolytiques lysent spécifiquement les liens des groupements métoxyyles, en libérant du méthanol, grâce à la pectinéméthylestérase (EC 3.1.1) et ensuite les liaisons glycosidiques (grâce à l'exo et l'endo polygalacturonase (EC 3.2.1) et des lyases (EC 4.2.2)). Ces enzymes contribuent à la libération des glucides cellulaires de la pellicule et de la pulpe, augmentent la vitesse de clarification du moût, le rendement en jus d'égouttage et la libération de substances technologiquement importantes, comme les anthocyanines, les composés d'arômes et les précurseurs aromatiques variétaux, etc. (BOSSO et PONZETTO, 1994).

Actuellement les enzymes pectolytiques sont obtenues à partir du champignon *Aspergillus niger* et, même si elles sont purifiées, elles contiennent toujours des activités résiduelles, dont quelques unes, comme les lipases et les  $\beta$ -glucosidases, peuvent être utiles, et d'autres nuisibles comme les cinnamyl-estérases qui hydrolysent les esters tartriques des acides hydroxycinnamiques du raisin, libérant de grandes quantités d'acides p-coumarique et férulique. L'enzyme cinnamate décarboxylase (CD) produite par la levure agit sur ces acides (DUGELAY *et al.*, 1993).

*S. cerevisiae* renferme aussi des activités pectolytiques, comme cela a été démontré par PARK *et al.* (1972), HASHIZUME et LATTIMER (1973/1974), MC KAY (1990), MURAD et FODA (1992) et GAINVORS *et al.* (1994). FEDERICI (1993) l'a trouvée dans *Cryptococcus albidus*.

Une activité pectolytique intense, dans la levure, capable de s'exprimer pendant la fermentation alcoolique, pourrait se révéler très importante comme fac-

teur de libération d'un substrat aromatique par la levure elle-même. Cela permettrait d'envisager d'éliminer l'emploi d'enzymes pectolytiques d'*Aspergillus niger*, qui sont exogène au raisin et pas toujours suffisamment purifiés des activités parasitaires indésirables.

- **Lipases et phospholipases.** Les lipases et les phospholipases des levures pourraient jouer un rôle important dans la libération de molécules sensoriellement actives à partir des précurseurs d'origine végétale. Dans les levures, les lipases sont actives autant à l'intérieur de la cellule qu'à l'extérieur et sont divisées en trois groupes selon leur spécificité (ROSE *et al.*, 1989) :

Les lipases non spécifiques catalysent la rupture complète du triglycéride en acides gras libres et glycérol, comme celles isolées chez *Candida cylindracea*, *Candida rugosa* et *Candida courbée* (YAMADA *et al.*, 1989 ; BENZONANA et ESPOSITO., 1989 ; LINFIELD *et al.*, 1989 ; MONTET *et al.*, 1989 ; LOTTI *et al.*, 1993, 1994) ;

Les lipases spécifiques, comme celles trouvées dans le *Candida paralipolytica*, *Yarrowia lipolytica* et *Rodotorula rubra* hydrolysent la position 1 et 3 du triacylglycérole (OTA *et al.*, 1989, 1982 ; GOMI *et al.*, 1989 ; MUDERHWA *et al.*, 1989). Elles présentent des pH optimaux entre 4 et 7.

Les lipases qui sont spécifiques pour l'acide gras, et non pour la position qu'il occupe sur la molécule de glycérol, sont présentes dans toutes les levures et sont actives à pH 6.

Il existe peu d'informations sur les lipases de *S. cerevisiae* ainsi que sur les phospholipases. Il semble que la plus grande partie des levures possèdent quatre types d'activités phospholipasiq ues.

Les phospholipases A1 et A2 coupent l'ester acylique respectivement dans les positions  $sn^{-1}$  et  $sn^{-2}$  et les lysophospholipases L1 et une L2 agissent respectivement sur ces dernières.

Les phospholipases C et D attaquent le lien phosphodiesterique en hydrolysant respectivement l'ester sur le glycérol ou sur la partie polaire. Une lécithinase a été trouvée dans des souches de *Rhodotorula* et *Cryptococcus* (ZVYAGINTSEVA *et al.*, 1989).

L'activité lipasique des levures peut être rapidement évaluée par spectrophotométrie (ROGEL *et al.*, 1989).

## ETAT DES RECHERCHES SUR LA GÉNÉTIQUE DES LEVURES

La sélection de levures en vue de l'amélioration des vins a fait des progrès remarquables ces dernières

années. Par contre, leur caractérisation génétique est très peu développée. Les facteurs qui retardent l'étude génétique moléculaire des levures vinaires sont : les difficultés d'identification non équivoque de diverses souches, les conditions de polyploïde ou aneuploïde (BLONDIN et VEZINHET, 1988 ; BAKALINSKI *et al.*, 1990 ; BIDENNE *et al.*, 1992 ;), l'homothallisme (THORNTON et ESCHENBRUCH, 1976) et les difficultés de sporulation.

Les études sont plus avancées en brasserie. *Saccharomyces carlbergensis* a fait l'objet de manipulations génétiques au niveau de la voie métabolique isoleucine-valine, pour réduire la production de diacétyle (VILLANUEBA *et al.* 1990 ; GOOSSENS *et al.* 1991 ; KIELLAND-BRANDT *et al.*, 1994 ; HENDERSON *et al.* 1985 ; CASEY *et al.* 1988).

Des interventions du même genre sont très limitées dans le cas des levures utilisées pour l'élaboration des vins. Elles pourront se développer lorsque l'on connaîtra mieux la structure du génome, la contribution spécifique des enzymes périplasmiques à la formation des substances aromatiques et les enzymes impliqués dans la formation des composés indésirables.

Certains exemples intéressants concernent l'amélioration des levures au moyen de techniques classiques de sélection ou de croisement. Parmi ces dernières, nous pouvons citer le cas des phénols aromatiques volatils. Le mécanisme de formation des composés indésirables est connu et on a sélectionné des souches à basse activité décarboxylasique de l'acide cinnamique non productrices de vinyl-phénols. Ces souches de levures appelées Pof-(phenolic-off flavor) ne donnent pas lieu au défaut olfactif « phénolique », défaut qui se manifeste, cependant, en proportion inverse à la complexité aromatique (GRANDO *et al.*, 1993 ; DUBOURDIEU, 1994).

Un autre cas intéressant concerne les composés terpéniques. Quelques mutants altérés dans la biosynthèse des stérols accumulent géraniol et même linalol. Les gènes correspondants ont été ensuite introduits dans le contexte génétique d'une levure de vins par des croisements répétés (CHAMBON *et al.*, 1990 ; JAVELOT *et al.*, 1991).

Toutefois une extension ciblée de ce type de recherches requiert la possibilité d'interventions génétiques programmées.

En ce qui concerne des interventions d'amélioration sur des espèces polyploïdes, dans lesquelles l'isolement des mutations récessives présente des difficultés pratiques insurmontables, les technologies de l'ADN recombinant représentent l'unique possibilité et donc

les problèmes relatifs à l'identification et à la caractérisation génétique des levures œnologiques, à la possibilité de les transformer, au choix des marqueurs génétiques, à l'identification des gènes codants pour des activités enzymatiques spécifiques acquièrent une importance cruciale.

Parmi les techniques de manipulation génétique utilisées, nous pouvons rappeler la fusion de protoplastes et la cytoduction. Cette dernière technique a été utilisée pour introduire à l'intérieur d'une souche œnologique le chromosome 1 (contenant le gène FLO5) d'une souche floculante (VEZINHET et BARRE, 1988 ; VEZINHET, 1989).

Toutefois, jusqu'à aujourd'hui, les cas dans lesquels les techniques de l'ADN recombinant ont été appliquées aux levures œnologiques sont assez limités. Après les premières approches de WILLIAMS *et al.* (1984), c'est seulement récemment que le gène pour l'enzyme malolactique de *Lactococcus lactis* et le gène pour l'enzyme maloalcoolique de *Schizosaccharomyces pombe* ont été introduits avec succès dans une souche de levure œnologique *S. cerevisiae* (VOLSCHEK *et al.*, 1997). L'expression optimale des deux gènes dans le *S. cerevisiae* a été obtenue seulement après y avoir transféré également le gène de transport de l'acide malique de *Schizosaccharomyces pombe*.

Une tentative a aussi été effectuée avec le cADN codant pour le caractère killer (BOONE *et al.*, 1990), mais les caractéristiques de la souche n'ont pas été améliorées. D'autres tentatives ont été annoncées pour augmenter la production de glycérol et d'acide lactique chez la levure vinicole. (BLONDIN, 1997).

## DIFFICULTÉS DE RECHERCHE, ACTUALITÉS ET PERSPECTIVES

La plus grande difficulté dans l'amélioration du profil aromatique aussi complexe que celui d'un vin réside d'abord dans la définition de « qualité », entendue aussi comme « caractère typique », ensuite dans la capacité de la mesurer, étant donné que la qualité résulte d'un concours de nombreux éléments interagissants et difficilement séparables, même au moyen des techniques analytiques disponibles aujourd'hui. En outre, il faut être conscient que, même si cela était possible, la chromatographie en phase gazeuse, par exemple, ne pourrait jamais évaluer une synergie olfactive ou gustative, et donc il est inévitable qu'en dernière analyse, l'on doive avoir recours aux sens humains tant pendant l'expérience pilote que pour un jugement définitif quant à la bonne qualité des résultats obtenus. Toutefois, l'analyse sensorielle n'est pas d'une grande aide dans les recherches fondamentales et il faut pou-

voir identifier des éléments objectifs et bien définis (molécules) de « qualité » et de « caractère typique », sur lesquels on puisse baser un programme d'intervention ciblée, moléculaire et physiologique au niveau de la levure et du cépage ou même seulement de sélection clonale.

Des résultats récents (DELFINI *et al.*, 1995) ont en outre démontré que dans le cas de certains vins blancs non aromatiques tels que le Blanc de Morgex, les caractéristiques aromatiques typiques ne sont pas tant déterminées par des molécules spécifiques provenant du cépage mais plutôt par un rapport quantitatif déterminé entre de nombreuses substances, par ailleurs communes à beaucoup de vins, provenant du métabolisme de la levure.

De plus, il ne faut pas négliger l'intervention métabolique de la flore lactique (fermentation malolactique) qui concourt à modifier considérablement le profil aromatique d'un vin (COCITO *et al.*, 1998 ; DELFINI *et al.*, 1995).

## CONCLUSIONS

La levure intervient dans la formation de l'arôme des vins de manière complexe, soit directement avec la production *ex novo* de composés sensoriellement actifs (ou arômes, ou marqueurs aromatiques), soit indirectement par la transformation de molécules inodores présentes dans certains raisins, à considérer comme des précurseurs des substances aromatiques.

Il semble prioritaire de procéder à une vérification objective de l'implication du blastomycète dans la formation de l'arôme spécifique imputable à l'origine végétale, en relation avec le substrat qu'il utilise, le moût, qui résume les caractéristiques génético-variétales du cépage et l'influence de l'environnement (sol, climat). En substance il faut procéder à la vérification des hypothèses suivantes qui peuvent aussi se révéler complémentaires :

a) il existe dans le moût d'un cépage non aromatique (comme dans ceux aromatiques, bien que masqué par l'arôme dominant) un potentiel odoriférant inexprimé qui se transforme en un pool de substances sensoriellement actives, seulement à la suite de l'intervention directe de la levure et en particulier de certaines souches (dites spécifiques), dotées d'un patrimoine enzymatique, donc génétique, approprié ;

b) la formation d'un cadre aromatique typique, plutôt qu'être la conséquence de la première hypothèse, valable seulement pour certains cépages, est dans la majorité des cas le résultat d'un équilibre déterminé de concentrations des différentes composantes odorantes.

Celles-ci seraient en grande partie connues et proviendraient de précurseurs normalement distribués chez *Vitis vinifera* et d'enzymes présentes chez *S. cerevisiae* capables de les transformer.

Les aspects scientifique et technologique des deux questions expérimentales sont importants, puisqu'à partir des résultats, dériveront des stratégies d'élaboration différentes pour obtenir une quantité déterminée tant au niveau de la sélection des levures pour œnologie, qu'au niveau du choix des techniques d'obtention du moût et de fermentation.

L'existence de précurseurs aromatiques variétaux est amplement démontrée dans la littérature, surtout en ce qui concerne les cépages aromatiques de la famille des muscats dont les moûts sont riches en terpènes soit à l'état combiné sous forme de glycosides (précurseurs inodores) soit sous forme libre (exprimant l'odeur caractéristique) (DI STEFANO *et al.*, 1981 ; BAYONOVE *et al.*, 1984 ; GÜNATA *et al.*, 1985b). Toutefois les terpènes combinés sont communs à beaucoup de cépages blancs et rouges, à baie neutre. A partir de leur profil terpénique qualitatif et quantitatif, RAPP (1988) et VERSINI *et al.* (1993) ont pu regrouper en classes ayant des relations phylogénétiques les cépages suivants : Moscato, Riesling, Müller-Thurgau, Chardonnay, Pinot Blanc et rouge, Silvaner, etc. Tandis que DI STEFANO *et al.* (1998) les a également trouvés dans le Barbera, le Canaiolo, le Grenache, le Nebbiolo et le Sangiovese. Outre les glycosides terpéniques, les précurseurs jusqu'à présent identifiés dans différents cépages par hydrolyse chimique et enzymatique, appartiennent aux classes des alcanols, des norisoprénoïdes, des benzénoïdes et des thiols (WILLIAMS *et al.*, 1982 ; STRAUSS *et al.*, 1987 a,b ; WINTERHALTER *et al.*, 1990 ; ALLEN *et al.*, 1991 ; DARRIET *et al.*, 1995).

L'existence de précurseurs spécifiques est au contraire moins certaine, ces derniers étant attribuables exclusivement à un cépage déterminé ou pour le moins à un groupe de cépages de la même provenance ampélographique.

Seuls pour les cépages Gewürtstraminer (VERSINI *et al.*, 1994), Riesling (STRAUSS *et al.*, 1987b ; WALDMAN et WINTERHALTER, 1992), Chardonnay (ARRHENIUS *et al.*, 1996), Caribernet Sauvignon (BAYONOVE *et al.*, 1990) et Sauvignon Blanc (DARRIET *et al.*, 1995 ; TOMINAGA *et al.*, 1996 et 1998a) a-t-on signalé des précurseurs et des marqueurs aromatiques correspondants, qui en l'état des connaissances, sembleraient appartenir en dominance à un seul cépage. Dans les vins Chardonnay et Riesling, on a aussi relevé le 2-éthyl-3-méthylmaléimide (BADERSCHNEIDER *et al.*, 1997), tandis que

son identification semble encore incertaine dans les moûts de Chardonnay et de Sémillon suite à une hydrolyse chimique des glycosides correspondants (SEFTON *et al.*, 1993, 1996).

Même dans le cas plus intéressant des thiols aromatiques tels la 4-méthyl-4-mercaptopentan-2-one et 3-méthylmercapto hexylacétate, caractéristiques de la note odorante de buis, qui dans le Sauvignon blanc, sont liés avec un pont disulfure à un acide aminé du précurseur et non pas à un carbohydrate comme dans le cas des terpènes, on ne peut encore exclure la possibilité qu'ils soient communs à d'autres cépages ayant des affinités génétiques. En fait, dans le même cépage, la note de poivron vert est exprimée par les méthoxy-pyrazines (ALLEN *et al.*, 1991), composés qui sont également présents dans le Cabernet Sauvignon (BAYONOVE *et al.*, 1975). L'existence de marqueurs spécifiques, appartenant donc exclusivement à un seul cépage paraît en conséquence plutôt improbable.

Il faut de toute façon tenir compte du fait que l'arôme exprimé par un vin est toujours la résultante odoriférante de la somme ou de la synergie d'un ensemble de plusieurs substances, qui dans la majorité des cas empêchent un seul composé sensoriellement actif, de marquer de manière très particulière un vin déterminé.

Dans le Sauvignon Blanc, il a été en outre démontré que les thiols ne sont pas liés à un glucide, mais à un acide aminé avec un lien S-cysteine conjugué (TOMINAGA *et al.*, 1996), desquels ils sont libérés par intervention directe d'enzymes appartenant à la levure. Il a été encore démontré que ces enzymes ne sont pas également exprimés dans les diverses souches d'une même espèce de levure. A partir de cet exemple, le travail aromatique de la levure sur les cépages semble tellement évident et déterminant qu'il ne peut être négligé et ni même comparé à celui d'une hydrolyse acide ou enzymatique provoquée en laboratoire (WILLIAMS *et al.*, 1984). Il faut, en fait, tenir compte des observations de GOMEZ *et al.* (1994) sur la formation possible d'artefacts chimiques pendant l'application des méthodes d'hydrolyse acide et enzymatique dans des conditions éloignées de celles physiologiques et technologiques, qui peuvent signaler comme précurseurs des composés qui, en réalité, ne pourraient jamais s'exprimer pendant la fermentation alcoolique.

Sous l'aspect génético-moléculaire et enzymologique, il semble important de considérer l'existence dans la levure (connue mais peu approfondie) d'enzymes (tels qu'estérases, glucosidases, lipases, protéases, peptidases, pectolytiques) ayant un site circonscrit dans le périplasme et dans la membrane cellulaire, donc en situation privilégiée et favorable, pour que leur action puisse se manifester à l'extérieur de la

cellule, surtout sur les structures colloïdales complexes qui ne sont pas transportables à l'intérieur et qui peuvent contenir des précurseurs d'arômes. Ces activités enzymatiques ont déjà été signalées dans la littérature (SUOMALAINEN et NURMINEN, 1972 ; SUOMALEINEN, 1981 ; ROSE *et al.*, 1989 ; ROSI, 1993 ; CHAROENCHAI *et al.*, 1997) en tant que transformateurs puissants de certains substrats existant dans le moût et dans le vin et donc ils sont à retenir comme étant de toute façon impliqués dans la transformation du cépage en vin.

Une autre question qui reste ouverte concerne la transformation des précurseurs aromatiques. On se demande si cette transformation peut survenir seulement par intervention d'enzymes (du raisin ou de la levure) ou si elle peut aussi survenir par simple hydrolyse chimique dans les conditions du moût d'abord et du vin ensuite.

On peut enfin se demander si le passage des précurseurs de la baie au moût survient par simple diffusion ou suite à l'intervention d'enzymes présentes dans la baie (pectolytiques, cellulolytiques, etc.).

Ce sont là des questions qui méritent de recevoir une réponse expérimentale rigoureuse afin d'une part de pouvoir expliquer scientifiquement l'apparition pendant la fermentation alcoolique de l'odeur variétale typiques d'un vin et d'autre part de mieux cibler l'application des techniques de génétique moléculaire en vue de l'amélioration des cépages et des levures utilisées pendant les vinifications. Ces données permettraient de choisir les méthodes les plus adaptées à la vinification.

Cette revue bibliographique constitue la première étude préliminaire inhérente au programme de recherche N. 255, intitulée « Mécanismes biochimiques et moléculaires chez les *Saccharomyces cerevisiae* impliqués dans la formation de marqueurs aromatiques variétaux des vins » afférent au Projet National Biotechnologie Végétale-1996/2000, domaine 6-micro-organismes utiles, financé par le Ministère pour les Politiques Agricoles.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALLEN M.S., LACEY M.J., HARRIS R.L.N. et BROWN W.V., 1991. Contribution of methoxypyrazines to Sauvignon blanc wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, 2, 109-112.
- ARRHENTIUS S.P., McCLOSKEY L.P. et SYLVAN M., 1996. Chemical markers for aroma of *Vitis vinifera* var. Chardonnay regional wines. *J. Agric. Food Chemistry*, **44**, 4, 1085-1090.

- ARYAN A.P., WILSON B., STRAUSS C.R. et WILLIAMS P.J., 1987. The properties of glycosidases of *Vitis vinifera* and comparison of their  $\beta$ -glucosidase activity with that of exogenous enzymes. An assessment of possible applications in enology. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 3, 182-188.
- BADERSCHNEIDER B., MESSERER M. et WINTERHALTER P., 1997. Isolation of 2-ethyl-3-methylmaleimide N- $\beta$ -D-glucopyranoside from Riesling wine. *Vitis*, **36**, 159-160.
- BAKALINSKY A.T. et SNOW R., 1990. The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **6**, 367-382.
- BARDI L., DELL'ORO V. et DELFINI C., 1992. Attività esterasica dei lieviti vinari. *Riv. Vitic. Enol.*, **45**, 4, 17-27.
- BARDI L., DELL'ORO V., DELFINI C. et MARZONA L., 1993. A rapid spectrophotometric method to determine esterase activity of yeast cells in an aqueous medium. *J. Inst. Brew.*, **99**, 385-388.
- BAYONOVE C.L., BAUMES R., GUNA Z., RANZUNGLES A. et SAPIS J.C., 1990. Il potenziale aromatico dei vitigni rossi non aromatici. *X Incontro su « Contributi ed influenza della chimica nella produzione, conservazione e commercializzazione del vino »*, Siena 7 giugno 1990, 1-34.
- BAYONOVE C.L. et CORDONNIER R.E., 1971. Recherches sur l'arôme du Muscat. III. Etude de la fraction terpénique. *Ann. Technol. agric.*, **20**, 4, 347-355.
- BAYONOVE C., CORDONNIER R. et DUBOIS P., 1975. Étude d'une fraction caractéristique de l'arôme du raisin de la variété Cabernet-Sauvignon ; mise en évidence de la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine. *C.R. Acad. Sc., Paris., Ser. D.*, **281**, 75-78.
- BAYONOVE C.L., GUNATA Z. et CORDONNIER R., 1984. Mise en évidence de l'intervention des enzymes dans les développements de l'arôme du jus de Muscat avant fermentation : la production des terpénols. *Bull. OIV*, **57**, 643-644, 740-758.
- BENZONANA G. et ESPOSITO S., 1989. *The Yeasts*, Rose and Harrison ed., 3, 435.
- BIDENNE C., BLONDIN B., DEQUIN S. et VEZINHET F., 1992. Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, **22**, 1-7.
- BIRON C., CORDONNIER R.E., GLORY O., GÜNATA Y.Z. et SAPIS J.C., 1988. Etude, dans le raisin, de l'activité  $\beta$ -glucosidase. *Connaissance Vigne Vin*, **22**, 2, 125-134.
- BITTEUR S., GÜNATA Y.Z., BRILLOUET J.M., BAYONOVE C.L. et CORDONNIER R.E., 1989. GC and HPLC of grape monoterpenyl glycosides. *J. Sci. Food Agric.*, **47**, 341-352.
- BLONDIN B. et VEZINHET F., 1988. Identification de souches de levures œnologiques par leurs caryotypes obtenus en électrophorèse en champ pulsé. *Rev. Fr. Œnol.*, **28**, 7-11.
- BLONDIN B., 1997. Génie génétique et amélioration des levures œnologiques. *Proceed. XXII<sup>e</sup> Congrès de la vigne et du vin*, Buenos Aires (Argentine), 5-9 December, 1-9.
- BOIDRON J.-N., CHATONNET P. et PONS M., 1988. Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Connaissance Vigne Vin*, **22**, 4, 275-294.
- BOONE C., SDICA A.M., WGNER J., DEGRÉ R., SANCHEZ C. et BUSSEY H., 1990. Integration of the yeast Kl killer toxin into the genome of marked wine yeasts and its effect on vinification. *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**, 37-42.
- BORSA D. et DI STEFANO R., 1993. I lipidi dell'uva. *Riv. Vitic. Enol.*, **46**, 1, 3.
- BOSSO A. et PONZETTO L., 1994. Macerazione delle bucce in presenza di enzimi pectolitici del commercio, influenza sull'andamento della fermentazione alcolica dei mosti e sulle caratteristiche olfattive dei vini. *Riv. Vitic. Enol.*, **3**, 45-66.
- BRILLOUET J., GÜNATA Y.Z., BITTEUR S., CORDONNIER R.E. et BOSSO C., 1990. Terminal Apiose, a new sugar constituent of grape juice glycosides. *J. Agric. Food. Chem.*, **37**, 910-912.
- CARTWRIGHT C.P., ROSE A.H., CALDERBANK J. et KEEMAN M.H.J., 1989. *The Yeasts*, Rose A.H., Harrison J.S. (eds), London, Academic Press, 3, 40-41.
- CASEY G.P., XIAO W. et RANK G.H., 1988. A convenient dominant selection marker for transfer in industrial strains of *Saccharomyces* yeast, SMR1 encoded the resistance for the herbicide sulfometuron methyl. *J. Institute Brewing*, **94**, 93-97.
- CASTINO M., 1984. Contributo ai procedimenti di valutazione dei colloidi glucidici nei vini. *Riv. Vitic. Enol.*, **32**, 163.
- CASTINO M. et DELFINI C., 1984. La filtrabilità dei vini in funzione del tenore in colloidi. *Vini Italia*, **5/6**, 45-56.
- CASTINO M. et DELFINI C., 1986. Studio sui fattori che determinano la cessazione di colloidi glucidici da parte dei lieviti. *Vignevini*, **1/2**, 33-40.
- CAVIN J.F., ANDIOC V., ETIEVANT P.X. et DIVIES C., 1993. Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 1, 76-80.
- CHAMBON C., LADEVEZA V., OULMOUDEN A., SERVOUSE M. et KARST F., 1990. Isolation and properties of yeast mutants affected in farnesyl diphosphate synthetase. *Current Genetics*, **18**, 41-46.

- CHAROENCHAI C., FLEET G.H., HENSCHKE P.A. et TODD B.E.N., 1997. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Austral. J. Grape Wine Res.*, **3**, 2-8.
- CHATONNET P., DUBOURDIEU D., BOIDRON J.N. et LAVIGNE V., 1993a. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J. Sci Food Agric.*, **62**, 191-202.
- CHATONNET P., 1993b. Fenoli volatili, influenze organolettiche e metodi di prevenzione. *Vignevini*, **7-8**, 26-34.
- CHATONNET P., LAVIGNE V., BOIDRON J.N. et DUBOURDIEU D., 1992. Identification et dosage de sulfures volatils lourds dans les vins par chromatographie en phase gazeuse et photométrie de flamme. *Sci. Aliments*, **12**, 3, 513-532.
- CIANI M. et ROSINI G., 1990. Selection of strains of *Saccharomyces cerevisiae* of « Sagrantino » D.O.C. for their wine-making properties. Preliminary results. *Ital. J. Food. Sci.*, **2**, 3, 165-172.
- CIOLFI G., DI STEFANO R. et DELFINI C., 1981. Influenza del l'anidride solforosa sui composti volatili prodotti dai lieviti. *Riv. Vitic. Enol.*, **12**, 519-527.
- COCITO C., MORIONDO G., GAIA P., PRA G., RIGAZIO L., PAGLIARA A., AMBRÒ S. et DELFINI C., 1998. L'oggettivo contributo del lievito selezionato nella vinificazione in rosso. *L'Enotecnico*, **5**, 81-88
- CONTERNO L. et DELFINI C., 1994. Peptidasic activity and ability of wine yeasts to utilise grape must proteins as the sole nitrogen source. *J. Wine Research*, **5**, 2, 113-126.
- CORDONNIER R.E., GÜNATA Y.Z., BAUMES R.L. et BAYONOVE C.L., 1989. Recherche d'un matériel enzymatique adapté à l'hydrolyse des précurseurs d'arôme de nature glucosidique du raisin. *Connaissance Vigne Vin*, **23**, 1, 7-23.
- CRAIG, J.T. et HERESZTYN T., 1984. 2-ethyl-3, 4, 5, 6-tetrahydropyridine, an assessment to its possible contribution to the Mousy off-flavor of wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **35**, 1, 46-48.
- DARRIET Ph., BOIDRON J. et DUBOURDIEU D., 1988. L'hydrolyse des hétérosides terpéniques du Muscat à petits grains par les enzymes périplasmiques de *Saccharomyces cerevisiae*. *Connaissance Vigne Vin*, **22**, 3, 189-195.
- DARRIET Ph., LAVIGNE V., BOIDRON J.-N. et DUBOURDIEU D., 1991. Caractérisation de l'arôme variétal des vins de Sauvignon par couplage chromatographie en phase gazeuse-odométrie. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **25**, 3, 167-174.
- DARRIET Ph., TOMINAGA V., BOIDRON J.-N. et DUBOURDIEU D., 1995. Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* var. Sauvignon wines, 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour Fragrance J.*, **10**, 6, 385-392.
- DELCROIX A., GÜNATA Y.Z., SAPI S J.-C., SALMON J.-N. et BAYONOVE C.L., 1994. Glycosidase activities of three enological yeast strains during wine-making, effect on the terpenol content of Muscat wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **45**, 3, 291-296.
- DELFINI C., 1979. Indagine sulla formazione di acido solfidrico nel corso della fermentazione alcolica e sua presenza nel vino. *Vini Italia*, **118**, 1-8.
- DELFINI C., 1985. Selezione di lieviti per uso enologico. Il contributo, isolamento e selezione di lieviti idonei alla produzione di « Cortese dell'Oltrepò Pavese D.O.C. ». *Vignevini*, **10**, 37-40.
- DELFINI C., 1987. Observations expérimentales sur l'origine et la disparition de l'alcool benzylique et de l'aldéhyde benzoïque dans les moûts et les vins. *Bull. O.I.V.*, **677-678**, 459-469.
- DELFINI C., 1992a. Criteri metodologici seguiti, risultati ottenuti e prospettive nella selezione di lieviti per uso enologico. *Biologia Oggi*, **6**, 1/2, 303-309.
- DELFINI C., 1992b. Innovative trends in oenology and in the selection of yeasts and malolactic bacteria for wine industry. *Riv. Vitic. Enol.*, **1**, 17-30.
- DELFINI C. et CIOLFI G., 1982. L'impiego dei lieviti selezionati in enologia, obiettivi, difficoltà e prospettive. Alcuni risultati sperimentali. *Vignevini*, **10**, 47-50.
- DELFINI C., CONTERNO L., GIACOSA D., COCITO C., RAVAGLIA S. et BARDIL L., 1992c. Influence of clarification and suspended solid contact on oxygen demand and long-chain fatty acid contents of free run, macerated and pressed grape musts. *Vitic. Enol. Sci.*, **47**, 69-75.
- DELFINI C., COSTA A., COCITO C., VOLA G., GROSJEAN V., BELLOCCHIA M., GAIA P., PRA G., RIGAZIO L., CONTERNO L., PAGLIARA A. et AMBRÒ S., 1995. Selezione dei lieviti per il miglioramento di vini bianchi D.O.C. Il contributo. *Vignevini Ricerca*, **4**, 12-15.
- DELFINI C., COSTA A., GAIA P., COCITO C. GROSJEAN V., BELLOCCHIA M. et PAGLIARA A., 1994. Selezione di lieviti specifici per il miglioramento di vini bianchi D.O.C. Blanc de Morgex-La Salle e di Chambave. *Viticoltura di Montagna*, **5**, 16-29.
- DELFINI C., COSTA A., COCITO C., VOLA G., GROSJEAN V., BELLOCCHIA M., GAIA P., PRA G., RIGAZIO L., MORIONDO G., CONTERNO L., PAGLIARA A. et AMBRÒ S., 1995. Selezione di lieviti specifici per il miglioramento di vini bianchi D.O.C. 2° Contributo, prove di cantina per la selezione di lieviti per la produzione di Blanc de Morgex-La Salle e di Chambave. *Vignevini*, **4**, 12-15.
- DELFINI C., COCITO C., RAVAGLIA S. et CONTERNO L., 1993. Influence of clarification and

- suspended grape solid materials on sterol content of free run and pressed grape musts in the presence of growing yeast cells. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 4, 452-458.
- DELFINI C. et DI STEFANO R., 1984. La benzaldeide, una sostanza aromatica responsabile dell'odore di mandorla amara nei vini. *Vignevini*, **7-8**, 9-10.
- DELFINI C. et GAIA P., 1977. Indagine sulla produzione di anidride solforosa nel corso della fermentazione alcolica nei passiti Malvasia della Lipari, Passito di Caluso e Recioto della Valpolicella. *Vini Italia*, **109**, 239-244.
- DELFINI C., GAIA P., BARDI L., MARISCALCO G., CONTIERO M. et PAGLIARA A., 1991. Production of benzaldehyde, benzyl alcohol and benzoic acid by yeasts and *Botrytis cinerea* isolated from grape musts and wines. *Vitis*, **30**, 253-263.
- DELFINI C., GAIA P. et BOSIA P.D., 1976. Formazione di anidride solforosa e di acido solfidrico da parte dei lieviti nel corso della fermentazione alcolica. *Vini Italia*, **103**, 251-264.
- DELL'ORO V., BARDI L. et DELFINI C., 1992. Esterasi nei lieviti e nei vini. *Vini Italia*, **3**, 49-54.
- DE REVEL G. et BERTRAND A., 1993. A method for the detection of carbonyl compounds in wine, glyoxal and methyl-glyoxal. *J. Sci. Food Agric.*, **61**, 267-272.
- DI STEFANO R., 1985a. Presenza di caratteri organolettici favorevoli in vini bianchi lungamente invecchiati. Indagine sui composti volatili e su alcuni parametri chimici e fisici di Riesling prodotti in Germania. *Riv. Vitic. Enol.*, **4**, 228-241.
- DI STEFANO R., 1985b. Gli etil fenoli nei vini. *Vignevini*, **5**, 35-38.
- DI STEFANO R., BOTTERO S., PIGELLA R., BORSA D., BEZZO G. et CORINO L., 1998. Precursori d'aroma glicosilati presenti nelle uve di alcune cultivar a frutto colorato. *L'Enotecnico*, **3**, 63-74.
- DI STEFANO R., CIOLFI G. et DELFINI C., 1981. Composti volatili prodotti dai lieviti. *Riv. Vitic. Enol.*, **8**, 342-355.
- DI STEFANO R. et CRAVERO M.C., 1992. The separation of hydroxycinnamates in wine. *Sci. Alim.*, **12**, 139-144.
- DI STEFANO R. et DELFINI C., 1984. Presenza di 1-ottanolo, di alcoli a lunga catena e di esteri acetici in un mosto base per Asti spumante e in mezzi fermentati da *Schizosaccharomyces*. *Vignevini*, **10**, 45-47.
- DI STEFANO R., MAGGIOROTTO G. et GIANOTTI S., 1992. Trasformazioni di Nerolo e Geraniolo indotte dai lieviti. *Riv. Vit. Enol.*, **XLV**, 1, 43-49.
- DUBOURDIEU D. et DARRIET Ph., 1993. Research on the varietal aroma of Sauvignon. *Vignevini*, **20**, 7-8, 38-41.
- DUBOURDIEU D., 1994. Levures et maîtrise de spécificité aromatiques. *Rev. Œnol.*, **73S**, 21-28.
- DUBOURDIEU D., DARRIET Ph., CHATONNET P. et BOIDRON J.-N., 1989. Intervention de systèmes enzymatiques de *Saccharomyces cerevisiae* sur certains précurseurs d'arôme du raisin. 4<sup>o</sup> Symp. Int. Œnol., Bordeaux (France), 15-17 juin 1989. In « *Actualités œnologiques 89* », Dunod, Paris, 1990, 151-159.
- DUGELAY I., GÜNATA Y.Z., SAPIS J.C., BAUMES R.L. et BAYONOVE C.L., 1993. Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 2092-2096.
- DU PLESSIS C.S. et VAN ROOYEN P.C., 1982. Grape maturity and wine quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **3**, 2, 41-45.
- FEDERICIF., 1983. Preliminary study of the pectolytic activity of *Cryptococcus albidus*. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **59**, 10, 509-512.
- FEUILLAT M., 1994. Origine et rôles œnologiques des colloïdes de levures. *Rev. Œnol.*, **73S**, 15-19.
- FEUILLAT M. et CHARPENTIER C., 1982. Autolysis of yeasts in Champagne. *Am. J. Enol. Vitic.*, **33**, 1, 5-13.
- FEUILLAT M., BRILLANT G. et ROCHARD J., 1980. Mise en évidence d'une production de protéases exocellulaires par les levures au cours de la fermentation alcoolique du moût de raisin. *Connaissance Vigne Vin*, **14**, 37-52.
- FORNACHON, J.C.M et LLOYD, B., 1965. Bacterial production of diacetyl and acetoin in wine. *J. Sci. Food Agric.*, **16**, 710-716.
- GAINVORS A., FREZIER V., LEMARESQUIER H., AIGLE M. et BELARDI A., 1994. Detection of polygalacturonase, Pectin-lyase and Pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast*, **10**, 10, 1311-1319.
- GALZY P., 1974. Génétique des levures et œnologie. *Vigne et Vins, n° spécial Colloque Int. Œnol. Arc et Senans*, Mai 1973, p.11.
- GIUDICI P., GRAZIA L. et PASSARELLI P., 1992. *Saccharomyces cerevisiae* culture autolysogenic at low temperature. *Am. J. Enol. Vitic.*, **43**, 3, 306-307.
- GIUDICI P., GRAZIA L. et PASSARELLI P., 1993. La capacità autolitica dei lieviti e la qualità dei vini. *Vitivinicoltura*, **37**, 34-39.
- GOMEZ E., MARTINEZ A. et LAENCINA J., 1993. Influence of SO<sub>2</sub> and yeast development on the evolution of C6 compounds during the first hours of vinification. *Ital. J. Food Sci.*, **3**, 263-268.
- GOMEZ E., MARTINEZ A. et LAENCINA J., 1994. Localization of free and bound aromatic compounds among skin, juice and pulp fraction of some grape varieties. *Vitis*, **33**, 1-4.

- GOMI K., OTA Y. et MINODA Y., 1989. *The Yeasts*, Rose and Harrison ed., 3, 436.
- GONIAK O.J. et NOBLE A.C., 1987. Sensory study of selected volatile sulfur compounds in white wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 3, 223-227.
- GOOSSENS E., DEBOURG A., VILLANUEBA K.D. et MASSCHELEIN C.A., 1991. Decreased diacetyl production by site directed integration of the ILV5 gene into chromosome XII of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur Brew. Conv., Proc. 23<sup>rd</sup> Congr. Lisbon*, IRL Press, Oxford, pp 289-296.
- GRANDO M.S., VERSINI G., NICOLINI G. et MATTIVI F., 1993. Selective use of wine yeast strains having different volatile phenols production. *Vitis*, **32**, 43-50.
- GUILLOUT-BENATIER M., SON H.S., BOUHIER S. et FEUILLAT M., 1993. Activités enzymatiques, glycosidases et peptidase chez *Leuconostoc oenos* au cours de la croissance bactérienne. Influence des macromolécules de levures. *Vitis*, **32**, 51-57.
- GÜNATA Y.Z., 1994 Etude et exploitation par voie enzymatique des précurseurs d'arome du raisin de nature glycosidique. *Rev. Œnol.*, **74**, 22-27.
- GÜNATA Y.Z., BAYONOVE C.L., CORDONNIER R.E., ARNAUD A. et GALZY P., 1990a. Hydrolysis of grape monoterpenyl  $\beta$ -D-glucosides by various  $\beta$ -glucosidases. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1232-1236.
- GÜNATA Y.Z., BAYONOVE C.L., TAPIERO C. et CORDONNIER R.E., 1990b. Hydrolysis of grape monoterpenyl glucosides by *Candida molischiana* and *Candida wickerhamii*  $\beta$ -glucosidases. *J. Sci Food Agric.*, **50**, 499-506.
- GÜNATA Y.Z., BAYONOVE C.L., BAUMES R.L. et CORDONNIER R.E., 1985b. The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components c.v. Muscat during first development and maturation. *J. Sci. Food Agric.*, **36**, 857-862.
- GÜNATA Y.Z., BIRON C., SAPIS J.C. et BAYONOVE C.L., 1989. Glycosidase activities in sound and rotten grapes in relation to hydrolysis of grape monoterpenyl glucosides. *Vitis*, **28**, 191-197.
- GÜNATA Y.Z., BRILLOUET J.M., VOIRIN S., BAUMES R.L. et CORDONNIER R.E., 1990c. Purification and some properties of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. Action on grape monoterpenyl arabinofuranosylglucosides. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 772-776.
- GÜNATA Y.Z., 1988. Sequential enzymic hydrolysis of potential aromatic glycosides from grape. *Carbohydr. Res.*, **184**, 139-149.
- GUYMOND J. F. et CROWELL E.A., 1965. The formation of acetoin and diacetyl during fermentation, and the levels found in wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **16**, 85-91.
- HASHIZUME T. et LATTIMER O.T., 1973/1974. Use of Ultrazym-100 for grape juice clarification. *Coletanea Instituto Tecnologia Alimentos*, **5**, 117-127.
- HENDERSON R.C.A., COX B.C. et TUBB R., 1985 The transformation of brewing yeasts with a plasmid containing the gene for copper resistance. *Current Genetics*, **9**, 133-138.
- HERESZTYN T., 1984. Methyl and ethyl amino acid esters in wine. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 916-918.
- HERESZTYN T., 1986. Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **37**, 2, 127-132.
- HERRAIZ T. et OUGH C.S., 1993. Formation of ethyl esters of amino acids by yeasts during the alcoholic fermentation of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 1, 41-48.
- HOCK R., BENDA I. et SCHREIER P., 1984. Formation of terpenes by yeasts during alcoholic fermentation. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **179**, 450-452.
- HOUTMAN A.C. et Du PLESSIS C.S., 1981. The effect of juice clarity and several conditions promoting yeast growth of fermentation rate, the production of aroma components and wine quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **2**, 2, 71-81.
- HOUTMAN A.C. et Du PLESSIS C.S., 1985. Influence du cépage et de la souche de levure sur la vitesse de fermentation et sur la concentration volatils du vin. *Bull. O.I.V.*, **648/649**, 235-246.
- HOUTMAN A.C., MARAIS J et Du PLESSIS C.S., 1980a. Factors affecting the reproducibility of fermentation of grape juice and of the aroma composition of wines. I. Grape maturity, sugar, inoculum concentration, aeration, juice turbidity and ergosterol. *Vitis*, **19**, 37-54.
- HOUTMAN A.C., MARAIS J et Du PLESSIS C.S., 1980b. The possibility of applying present-day knowledge of wine aroma components, influence of several factors on fermentation rate and ester production during fermentation. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **1**, 1, 27-33.
- JAVELOT C., GIRARD P., COLONNA-CECCALDI B. et VLADESCU B., 1991. Introduction of terpene-producing ability in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnology*, **21**, 239-252.
- KIELLAND-BRANDT M.C., NILSSON-TILGREN T., GJERMENSEN C., HOLMBERG S. et PEDERSEN M.B., 1994. Genetic analysis of brewers' yeast. *In The Yeasts*, 2<sup>nd</sup>, Vol. 6, A.H.Rose, J.S. Harrison, A.E. Wheals (eds), Academic Press, London.
- KLINGSHIRN L.M., LIU R. et GALLANDER J.F., 1987. Higher alcohol formation in wines as related to the particle size profiles of juice insoluble solids. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 3, 207-211.

- KUNKEE R.E., PILONE G.J. et COMBS R.E., 1965. The occurrence of malo-lactic fermentation in Southern California wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **16**, 219-223.
- LAVIGNE V., BOIDRON J.-N. et DUBOURDIEU D., 1993. Dosage des composés soufrés volatils légers dans les vins par chromatographie en phase gazeuse et photométrie de flamme. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **27**, 1, 1-12.
- LINFIELD W.M., BARAUSKAS R.A., SIVIERI L., SEROTA S. et STEVENSON R.W., 1989. *The Yeasts*, Rose and Harrison ed., 3, 435.
- LOTTI M., GRANDORI R., FUSETTI F., LONGHI S., BROCCA S., TRAMONTANO A. et ALBERGHINA L., 1993. Cloning and analysis of *Candida cylindracea* Lipase sequences. *Gene*, **124**, 1, 45-55.
- LOTTI M., TRAMONTANO A., LONGHI S., FUSETTI F., BROCCA S., PIZZI E. et ALBERGHINA L., 1994. Variability within the *Candida rugosa* lipases family. *Protein Eng.*, **7**, 4, 531-535.
- LUBBERS S., 1993. Effet colloïde protecteur d'extraits de parois de levures sur la stabilité tartrique d'une solution hydro-alcoolique modèle. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **27**, 1, 13-22.
- LURTON L., 1988. Etude de la protéolyse des levures de vinification lors de l'élevage d'un vin sur ses lies. *Rev. Fr. Œnol.*, **1**, 35-41.
- MALVY J., ROBILLARD B. et DUTEURTRE B., 1994. Influence des protéines sur le comportement de la mousse des vins de Champagne. *Sci. Aliments*, **14**, 87-98.
- MASCARENHAS M.A., 1984. The occurrence of malo-lactic fermentation and diacetyl content of dry table wines from Northeastern Portugal. *Am. J. Enol. Vitic.*, **35**, 1, 49.
- MASNEUF I., 1996. Recherches sur l'identification génétique des levures de vinification. Applications œnologiques. *Thèse de doctorat*, Université de Bordeaux II.
- MC KAY A.M., 1990. Degradation of polygalacturonic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **11**, 41-44.
- MATEO J. et DI STEFANO R., 1997. Description of the  $\beta$ -glucosidase activity of wine yeasts. *Food Microbiology*, **14**, 583-591.
- MOINE-LEDOUX V. et DUBOURDIEU D., 1999. An invertase fragment responsible for improving the protein stability of dry white wines. *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 537-543.
- MOINE-LEDOUX V., PERRIN A., PALADIN I. et DUBOURDIEU D., 1997. Premiers résultats de stabilisation tartrique des vins par addition de manno-protéines purifiées (Manostab™). *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **31**, 1, 23-31.
- MONTET D., RATOMAHENINA R., PINA M., GRAILLE J. et GALZY P., 1989. *The Yeasts*, Rose and Harrison ed., 3, 435.
- MUDERHWA J.M., RATOMAHENINA R., PINA M., GRAILLE J. et GALZY P., 1989. *The Yeasts*, Rose and Harrison ed., 3, 435.
- MURAD H.A. et FODA M.S., 1992. Production of yeast polygalacturonase on dairy wastes. *Biores. Technol.*, **41**, 247-250.
- NOBLE A.C., STRAUSS C.R., WILLIAMS P.J. et WILSON B., 1988. Contribution of terpene glycosides to bitterness in Muscat wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **39**, 2, 129-130.
- OTA Y., GOMI K., KATO S., SIGIURA T. et MINODA Y., 1982. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2885.
- OTA Y., NAKAMIYA T. et YAMADA K., 1989. *The Yeasts*, Rose and Harrison ed., 3, 435.
- PARK Y.K., FUJURI E. et LIMA D.C., 1972. Production of pectolytic enzymes by fungi. I. Isolation of microorganisms from soil and activities of enzymes in the clarification of different fruit juices. *Rev. Brasileira Tecnol.*, **3**, 4, 197-203.
- PARK S.K., BOULTON R.B., BARTRA E. et NOBLE A.C., 1994. Incidence of volatile sulfur compounds in California wines. A preliminary survey. *Am. J. Enol. Vitic.*, **45**, 3, 341-344.
- PARKKINNEN E. et SUOMALAINEN H., 1982a. Esterases of Baker's yeast. II. Substrate specificities towards esters formed during sugar fermentations. *J. Inst. Brew.*, **1-2**, 88, 34-38.
- PARKKINNEN E. et SUOMALAINEN H., 1982b. Esterases of Baker's yeast. III. The ester/acid ratio in model solutions. *J. Inst. Brew.*, **3-4**, 88, 98-101.
- PILONE G.J., KUMKEE R.E., WEBB A.D., 1966. Chemical characterization of wine fermented with various malo-lactic bacteria. *Appl. Microbiol.*, **14**, 609-615.
- POSTEL W. et MEIER B., 1983. Verhalten von 2-Acetylactat, 2-acetohydroxybutyrat, Diacetyl, 2-3-Pentandion und Acetoin während des bakteriellen Apfelsaureabbaus in Wein. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **176**, 356-359.
- RADLER F., 1962. Die Bildung von Acetoin und Diacetyl durch die Bakterien des Biologischen Saureabbaus. *Vitis*, **3**, 136-143.
- RAPP A., 1988. *Wine Analysis*, ed. Linsken H.F., Jackson F., Springer-Verlag, Berlin, 29-66.
- RAPP A., GUNTERT M. et ALMY J., 1985. Identification and significance of several sulfur-containing compounds in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**, 3, 219-221.
- RAPP A., SUCKRAU I. et VERSINI G., 1993. Studies on wine and grape aroma. Varietal characterization of

- neutral vine cv. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **197**, 3, 249-254.
- RAUHUT D., 1990. Trace analysis of sulphurous off-flavours in wine caused by extremely volatile s-containing metabolites of pesticides E.G. orthene. *Actualités Œnologiques 89. CR 4<sup>e</sup> Symp. Int Œnol.*, Bordeaux 1989. Dunod, Paris. 482-487.
- RAVAGLIA S. et DELFINI C., 1993. Production of medium chain fatty acids and their ethyl esters by yeast strains isolated from musts and wines. *Ital. J. Food Sci.*, **1**, 21-36.
- RAZUNGLES A., BAYONOVE C. et CORDONNIER R.E., 1988. Grape carotenoids during maturation period and localization in mature berries. *Am. J. Enol. Vitic.*, **39**, 1, 44-48.
- ROBILLARD M., 1994. Généralités sur la mousse. Entretiens Scientifiques Lallemand 1994. *La microbiologie des vins mousseux*, Ravatis (France), 26-27 avril, 3, 55-57
- ROGEL A.M., STONE W.L. et ADEBONOJO F.O., 1989. A novel spectrophotometric assay for lipase activity utilizing *cis*-parinaric acid. *Lipids*, **24**, 6, 518-525.
- ROMANO P., SUZZI G., ZIRONI R. et COMI G., 1993. Biometric study of acetoin production in *Hanseniaspora guillermundii* and *Kloeckera apiculata*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 6, 1838-1841.
- ROSE H.A. et HARRISON J.S., 1989. *The yeasts. Metabolism and Physiology of yeasts*, 3, 434-438.
- ROSI J., 1993. Attività proteolitica extracellulare in lieviti di interesse enologico. *Ann. Microbiol. Enzimol.*, **43**, 77-84.
- ROSI I., COSTAMAGNA L. et BERTUCCIOLI M., 1987. Screening for extracellular acid protease(s) production by wine yeasts. *J. Inst. Brew.*, **93**, 322-324.
- ROUS C.V. et SNOW R., 1983. Reduction of higher alcohols by fermentation with a leucine-auxotrophic mutant of wine yeast. *J. Institute Brewing*, **89**, 274-278.
- SCHREIER P., DRAWERT F. et JUNKER A., 1975. Über die Biosynthese von Aromastoffen durch Mikroorganismen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **158**, 351-360.
- SCHOBINGER U., STUSSI J. et WALDVOGEL R., 1992. Bedeutung der Weinkolloide für die sensorische Qualität des weins. *Mitteilungen Klosterneuburg*, **42**, 205-212.
- SEFTON M.A., FRANCIS I.L. et WILLIAMS P.J., 1993. The volatile composition of Chardonnay juices, A study by flavor precursors analysis. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 359-370.
- SEFTON M.A., FRANCIS I.L. et WILLIAMS P.J., 1993. The free and bound volatile secondary metabolites of *Vitis vinifera* grape cv. Semillon. *Austral. J. Grape Wines Res.*, **2**, 179-183.
- SIMPSON R.F. et MILLER G.C., 1983. Aroma composition of aged Riesling wine. *Vitis*, **22**, 1, 51-63.
- SOLI M.G., ROMANO P., TINI V. et ZAMBONELLI C., 1977. Studio e selezione dei lieviti da « Lambrusco ». I lieviti della rifermentazione in bottiglia. *Vignevini*, **4**, 8/9, 15-18.
- STRAUSS C.R., WILSON B. et WILLIAMS P.J., 1987a. 3-oxo- $\alpha$ -ionol, Vomifoliol and roseoside in *Vitis vinifera* fruit. *Phytochemistry*, **26**, 7, 1995-1997.
- STRAUSS C.R., WILSON B., ANDERSON R. et WILLIAMS P.J., 1987b. Development of precursors of C13 nor-isoprenoids flavorants in Riesling grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 1, 23-27.
- STRAUSS C.R., WILSON B. et WILLIAMS P.J., 1988. Novel monoterpene diols and diol glycosides in *Vitis vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 569-573.
- STRYDOM M., 1985. Caractérisation de quatorze souches de levures par leurs capacités de fermentation et par la composition et qualité du vin produit. *Bull. O.I.V.*, **648/649**, 218-227.
- SUOMALAINEN H., 1981. Yeast esterases and aroma esters in alcoholic beverages. *J. Inst. Brew.*, **9-10**, 87, 296-300.
- SUOMALAINEN H. et NURMINEN T., 1972. Isolation and properties of the plasma membrane of the yeast cell. *4<sup>th</sup> Int. Fermentation Symp.* 19-25 March 1972, Kyoto, Japan, 166-167.
- THORNTON R.J., 1985. The introduction of flocculation into a homothallic wine yeast. A practical example of the modification of winemaking properties by the use of genetic techniques. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**, 47-49.
- THORNTON R.J. et ESCHENBRUCH R., 1976. Homothallism in wine yeasts. *Antonie van Leeuwenhok*, **42**, 503-509.
- TINI V., ROMANO P., SOLI M.G. et ZAMBONELLI C., 1976. Studio e selezione clonale di lieviti per enologia. *Vignevini*, **3**, 11/12, 17-20.
- TOMINAGA T., DARRIET Ph. et DUBOURDIEU D., 1996. Identification of 3-mercaptoethanol acetate in Sauvignon wine, a powerful aromatic compound exhibiting box-tree odor. *Vitis*, **35**, 4, 207-210.
- USSEGLIO-TOMASSET L., 1975. Costituenti volatili dei vini in relazione al metabolismo dei lieviti. *Annali Istituto Sperimentale Enologia*, Asti, **4**, 239-266.
- USSEGLIO-TOMASSET L. et DI STEFANO R., 1981. Variabilità nella produzione di componenti volatili da parte dello stesso stivite di lievito. *Vini Italia*, **23**, 249.
- VERSINI G., SCIENZA A., DALLA SERRA A., DELL'EVA M. et MARTIN C., 1990. Rôle du clone de l'époque de récolte sur l'arôme du Chardonnay, aspects analytiques et sensoriels. *4<sup>e</sup> Symp. Int. Œnol.*, Bordeaux 15-17 juin 1989 ; in, *Actualités Œnologiques 89*, Dunod, Paris, 1990, 69-74.

- VERSINI G., DALLA SERRA A., MONETTI A., DE MICHELI L. et MATTIVI F., 1993. Free and bound grape aroma profiles variability within the family of Muscat-called varieties. *Actes Symp. Int. « Connaissance aromatique des cépages et qualité des vins »*, Montpellier, 9-10 février, 12-21.
- VERSINI G., RAPP A., DALLA SERRA A., PICHLER U. et RAMPONI M., 1994. Methyl trans geranate and farnesoate as markers for Gewüztraminer grape skins and related distillates. *Vitis*, **33**, 3, 139-142.
- VEZINHET F., 1989. Obtention par recombinaison intragénomique de clones non-moussants à partir d'une souche de levures d'intérêt œnologique *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Aliments*, **9**, 253-265.
- VEZINHET F. et BARRE P., 1988. Transfer by cytoduction of the FLO5 flocculation gene in an enological yeast strain. *8<sup>th</sup> Int. Biotechnology Symp.*, Paris, Book of Abstracts, 101. Société Française de Microbiologie.
- VILLANUEBA K.D., GOOSSENS E. et MASSCHELEIN C.A., 1990. Subthreshold vicinal diketone levels in larger brewing yeast fermentations by means of ILV5 gene amplification. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **48**, 111-114.
- VOIRIN G., BAUMES R.L., BITTEUR S., GÜNATA Y.Z. et BAYONOVE C.L., 1990. Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 6, 1373-1378.
- VOLSCHENK H., VILJOEN M., GROBLER J., BAUER F., LONVAUD-FUNEL A., DENAY-ROLLES M., SUBDEN R.E. et VAN VUUREN H.J.J., 1997. Malolactic fermentation in grape musts by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**, 2, 193-197.
- WALDMAN D. et WINTERHALTER P., 1992. Identification of a novel vitispirane precursor in Riesling wine. *Vitis*, **31**, 3, 169-174.
- WILLIAMS S.A., HODGES R.A., STRIKE T.L., SNOW R. et KUNKEE R.E., 1984. Cloning the gene for the malolactic fermentation of wine from *Lactobacillus delbrueckii* in *Escherichia coli* and yeasts. *Applied Environmental Microbiology*, **47**, 283-293.
- WILLIAMS P.J., STRAUSS C. R. et WILSON B., 1980. Hydroxylated linalool derivatives as precursors of volatile monoterpenes of Muscat grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 766-771.
- WILLIAMS P.J., STARUSS R., WILSON B. et MASSY-WESTROPP R.A., 1982. Use of C18 reversed-phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and nor-isoprenoid precursors from grape juice and wines. *J. Chromatography*, **235**, 471-480.
- WILLIAMS P.J., STRAUSS C.R., WILSON B. et MASSY-WESTROPP R.A., 1982. Studies on the hydrolysis of *Vitis vinifera* monoterpene precursor compounds and model monoterpene  $\beta$ -D-glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 1219-1223.
- WILLIAMS P., STRAUSS C., WILSON B. et MASSY-WESTROPP R., 1984. Studies of the hydrolysis of *Vitis vinifera* monoterpene precursors compounds and model monoterpene  $\beta$ -D-glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 1215-1223.
- WILSON B., STRAUSS C. et WILLIAMS P., 1984. Changes in free and glycosidically-bound monoterpenes in developing Muscat grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 919-924.
- WILSON B., STRAUSS C. et WILLIAMS P., 1986. The distribution of free and glycosidically-bound monoterpenes among skin, juice, and pulp fractions of some white grape varieties. *Am. J. Enol. Vitic.*, **37**, 107-111.
- WINTERHALTER P., 1992. *Thermal and enzymatic conversions. Flavor precursors*, Güntert, Takeoka, Teranishi ed., ACS, Washington D.C.
- WINTERHALTER P., SEFTON M.A. et WILLIAMS P.J., 1990. Volatile C13-norisoprenoid compounds. *Am. J. Vitic. Enol.*, **41**, 4, 277-283.
- YAMADA K. et MACHIDA H., 1989. *The Yeasts*, Rose and Harrison ed., **3**, 435.
- ZVYAGINTSEVA I.S. et PITRYUK I.A., 1989. *The Yeasts*, Rose and Harrison ed., **3**, 438.